

内分泌攪乱化学物質の高等動物における影響評価

吉川 泰弘

東京大学大学院 農学生命科学研究科

ご紹介ありがとうございました。我々のグループは黒田班の一翼を担っています。内分泌攪乱化学物質の神経系発達に対する影響を、高等動物でどのようにして評価していくか？またその結果をヒトにどのように外挿していくか？というのが、与えられた課題です。ここ 1 年半ぐらいはラットを中心に研究を進めてきております。来年からはサルの実験も本格的に始まるということで、今日は主に基本戦略について、今までに得られたデータを含めて、紹介したいと思います。

本研究班はチンパンジー、サルとラットの基盤研究を行う東大の吉川、根岸、安本、須崎、それからラットの注意行動とサル類の学習解析をしている星薬科大の川崎、サル類の行動解析を行う日本女子大の小山、下村、そして総括の黒田先生という、かなりヘテロなグループで仕事をしております。目的はスライドの一番手前のラットからサル、チンパンジー、ヒト、は私が代表ではありませんが、ヒトまで何とか解析結果を外挿したいということです。

今日のトピックとしては、1) 内分泌攪乱化学物質のいわゆる ADME (吸収・分布・代謝・排出) を種差を越えて外挿することをどのようにしたらいいだろうか？ 2) それからメイン・テーマである神経行動の外挿をどのように行うか？またその攻め方という問題、3) 最後にラボラトリーワークとニホンザルのフィールドワークとの共同研究が必要だという、3つのポイントについて紹介したいと思います。

このスライドはビスフェノール A (BPA) を対象に取り上げているわけです。BPA を投与したあとの各種動物の血中濃度の推移を示したものです。上に 10 mg/kg 経口投与の例が出ておりますが、経口投与をした場合、10 mg ですと、ラットは、ELISA キット (モノクローナル抗体を使った非結合型の BPA を測るキット) で、検出ギリギリのレベルです。図ではブルーのポイントになっています。なお、ラットに関しては各測定点で 4 頭を使っております。

それに比べて BPA は、サルでは非常に効率よく血中に移行します。サルは各群 3 頭の平均を示しております。チンパンジーは各 2 頭です。2 個体それぞれ示してありますが、チンパンジーではちょうどラットとサルの中間のところに値が出てきます。また、10 mg の皮下投与の場合も結果は全く同じで、サル (*macaques monkey*) が一番効率よく血中に移行しており、チンパンジーが中間、ラットが一番低いという傾向になっております。これは 100 mg/kg (ドーズが高いのでチンパンジーは省いてありますが) の高容量においてもラット、サルで、同じような傾向になっております。

このことは何を意味するかといいますと、一般に種を超えて外挿するのに、安全係数 (セーフティ・インデックス) という格好でリスク評価を上げていくわけですが、それが必ずしも単純な系統発生に該当しないことを意味しています。注意しなければいけないと思います。当然、こうした現象はそれぞれの化学物質によっても違うと思いますし、血中への移行度、あるいは実際の代謝酵素、CYP 450、あるいは抱合酵素等による代謝の差、といった種差があると思います。まず最初に投与量を外挿する場合、アприオリに系統発生を上げていって、そのままポイントを上げればいいのかというわけにいかない、という点を指摘しておきたいと思います。

これまでの比較では単回投与の反応を見たわけですが、実際にヒトのモデルとするときの実験デザインには様々な制限が付きまします。なるべくヒトが暴露される条件と類似の実験をしたいと思うのは当然です。日常的暴露となると、例えば BPA のように非常に急速に代謝されるものは、ほとんど毎日連続投与するという格好になるわけです。ラットの場合は妊娠期間 21 日、哺乳期間も 21 日ですから、毎日、経口投与することはそう難しいことではありません。

しかし、同じことをサル類でやろうとするのは、現実的にはほとんど不可能です。マカカ属のサル類では、平均妊娠期間 155 日、哺乳期間は大体半年です。母親に毎日ゾンデで強制的に一定量を経口投与すると、それだけで、ストレスのために実験結果は何を見ているかわからないこととなります。そうすると、母親に負担をかけないために、1 か月に 1 回ぐらいの交換ですむ、オスモティック・プレッシャー (浸透圧) ポンプを用いた、皮下投与になります。カプセルを皮下に埋め込むこととなります。

そうすると、先程の外挿を使えば大体ラットとサルが係数で 10 倍、種を問わず経口投与と皮下投与の血中移行度が 10 倍となると、ほぼ 100 ぐらいの係数をかけて、あるいは 100 分の 1 のドーズで、サルで実験を始めるという格好になります。チンパンジーの場合は健康動物を用いて、単回投与で先程のような外挿をする以外、動物倫理上、実験は不可能です。現在のところ長期投与の実験は難しいということになります。

一方、TCDD のような残留性の長い物質に関しては、ラットあるいはサルの場合でも、週に 1 回あるいは 2 週間に 1 回の経口投与が可能になるので、方法論的な違いはなく、ヒトへの外挿は非常にやりやすいのです。チンパンジーの実験では、TCDD は単回投与を含めて、動物倫理委員会で認可されることがないので、外挿がこのレベルから不可能になるという問題があります。いずれにせよ、神経行動を測定する際の最初の段階として、投与量と投与方法をどのような値で外挿していくか？という基本的解析がそれぞれの物質について必要になると思います。

第 2 に、神経系、特に神経行動解析の難しさは、内分泌系組織に比べ、神経系というのは非常に系統発生上の違いが大きい点です。スライドにいろいろな動物の脳が載っているわけですが、簡単に系統を上げて外挿するといっても容易ではありません。例えば哺乳類のような新皮質のかなり発達した動物と、鳥類、魚類のような線状体むき出しの動物、あるいは神経系の末端が大きくなったアタラ体やキノコ体のレベルで止まっているような昆虫や軟体動物とを、同じように外挿するのは非常に難しいという面があります。更に、ヒトに最も近い霊長類、特に旧世界ザル、チンパンジー、ヒトと並べてみますと、スライドを見ただけで明らかのように、その大きさ、特によく言われるように、前頭前野の発達に関しては非常に異なっている。こういうものを外挿していかなければならないという問題があります。

さて、神経系の機能評価に関しては、基本的には何段階かのレベルにおいて、アセスメントしていきたいと考えています。スライドが一番基本になるサーカディアン・リズムです。これからしばらくラットの系について説明します。げっ歯類は夜行性ですから、夜中をピークとして大体きれいな動きのパターンを出すわけですが、私たちが見つけたミュータントマウスで、行動異常と情動異常を示す動物です。遺伝子ではキネシン関連の遺伝子に異常があることがわかりました。このマウスではサーカディアン・リズムがスライドで示したように狂っています。ここまで昼夜を含めてリズムが狂うと、測定してもかなりきれいに結果が出るのですが、例えば BPA などでは、そんなに見事な差にはなってきません。

これは妊娠ラットに BPA を 4 mg、40 mg、400 mg というドーズで経口投与した子どもの 1 日の行動です。特にラットで言えば覚醒時、すなわち夜の時期の動きについて見ますと、4 週齢の雌のグループだけ 40 mg/kg で無動時間というか、止まっている時間が有意に高いという結果が得られております。ここでは BPA の影響に性差があり、単純な容量反応は見られず、発達によりそうした傾向は消失するという複雑な結果が見られます。

第 2 段のレベルは新奇の場面、特にオープンフィールドのような新しい場面に置かれたときに、どういう行動をどのように出すか？という問題です。従来はビデオに撮ったものを、人間が紙と鉛筆で記録して示すという方法が多く用いられていたわけです。我々はそれを全部コンピュータで自動化しようということで、キネクラスター（動画分類という商標名）を開発しました。実は先月この第 1 号機が市販されることになりました。値段は全部セットで 2 万ドルです。オープンフィールドでの行動をビデオに取り込んで、それをデジタル化した画面の中で要素に分けて計算していきます。どういう行動に分かれていくかというアルゴリズムがここに書いてあります。実際にはデジタル化したそれぞれの画面から対象を自動抽出して、重心あるいは長径、短径、また極在重心の位置情報を解析していくわけです。結果は非常に簡単で、例えばこのスライドのようにカラーバーコードで表示するシステムになっております。

これはキネクラスターが解析したラットのオープンフィールド行動の時系列解析結果です。下段はプロのラット行動学者が解析した行動分類で、移動、立ち上がり、ストレッチング、不動あるいはスニッピング（臭い嗅ぎ行動）：ヒゲだけであるもの、頭を動かしながらやるもの、あるいは洗顔や毛繕いといった項目に分かれています。大体、キネクラスターとプロの観察者との一致率が 70% ぐらいになっております。実際に BPA を暴露した妊娠ラットの子について、4 週、8 週、12 週齢で雄雌両群について、このオープンフィールドの試験を行い、キネクラスターで分析してみました。ここに出ているように、8 週齢雄で低容量、4 mg/kg/day のところで有意に毛繕いの増加が見られております。

もう一段上のレベルは、学習・記憶ということになります。水迷路あるいはシャトルボックス・テスト（能動、受動回避試験）で、これは大体、既存のものを使うことにしております。このスライドは能動回避試験の結果です。BPA 投与グループの 8 週齢雄で、第 1 セッションの理解が有意に低いという傾向が出ております。これはオープンフィールドの結果（毛繕いが多くでた）と関連する可能性が考えられます。学習能力が悪いというより、外界の刺激に対する反応性が低下している可能性が考えられます。

第 4 のレベルは薬剤投与実験です。これまでは 24 時間のフリーの動きから、新奇場面あるいは学習能力等を追ってくるものでした。しかし、それでも実際には顕在化しない行動の異常があります。刺激に対する反応性の閾値は変わっているが、通常の状態では顕在化しないものです。すなわち微小的に機能を障害されたケースを、どうやって顕在化するか？という問題があるわけです。そのときに考えているのが、薬剤誘発試験で、 Medikation・バイアス・テストという名前にしてあります。実際にはカフェイン、アンフェタミン、あるいは L-ドーパといった興奮系の薬剤を投与して、行動の変異がどの程度のものであるか、あるいはその域値のセッティングポイントがずれているかどうかを確かめる試験です。

これはオープンフィールドの行動で比較したものです。正常の同腹子の行動に対して、カフェイン、この場合は 10 mg を投与すると、行動は全く変わってきます。それを要素分析してみますと、カフェインの投与によって、移動あるいは立ち上がりといった興奮性の動き、多動が多くなります。他方、臭い嗅ぎや毛繕いといった行為が減ってくるのがわかります。

ここからはサルの話になります。本プロジェクトではラットで行った試験を基本的にサルで行い、比較します。サルの方はラットに比べると、その行動はかなり複雑になります。ここには 6 通りを示しています。専門のサル行動学者の分類は 14 通りぐらいに分かれます。回転運動とか立ち上がり、座位などを含めて、いくつかの基本行動があるわけです。この場合の動画処理もラットと同様に、背景からサルを抽出して、運動差分、全面積、長軸あるいは短軸長、重心を求めます。その他、動きの少ないものについては、スライドのようにパーツの動きをメルクマールにしてアルゴリズムを作っていきます。

これは一番基本になる 4 種類の動きについて、アルゴリズムを使って解析したものです。この場合は要素が 4 つですから、コンピュータと観察者の一致率は 92% という非常に高い率になっています。サルの動きは複雑なものですから、14 通りまでいくとなると、なかなか正確なアルゴリズムを組むのが困難で、まだ出来ておりません。

さて、妊娠サルに内分泌攪乱化学物質を投与して生まれたあとになりますが、この場合は母子の相互作用から分析がはじまります。生まれてから 6 か月間ビデオで追うことになります。お母さんから子どもに対して示す行為は、抱きかかえ、毛繕いとか子供に対するリップ・スマッキング、常同（ステレオタイプ）行動などがあります。逆に子どもの方から母親に働きかける項目というのは、腹部接触、背部接触とか、アーム/レッグ・コンタクト、アップサイド・ダウン等があります。また子供が自分自身で乳を飲んだり、背中に上ったり、寝たり、騒いだりという相互作用とは別の行為項目を決めておきます。こういう項目がそれぞれの発達過程で、離乳までの間にどのように出てきて、どのようにシフトするか。それが BPA、あるいは TCDD のようなものに曝露されたことによって、どのようにずれるかということを追います。

6 か月齢を過ぎると、サルは社会性を求めるために、子どもどうし 2 匹飼いをするわけです。これはラットのオープンフィールドに相当するような新奇場面の会わせ実験ということになります。どちらかといえば、他個体に対して積極的に働きかける行動群、それに対して自分の方に向かうセルフ・ダイレクテッドな行動群を項目に挙げてあります。これを大体 6 か月齢から 1 歳齢まで、例えば BPA-BPA 群、あるいは BPA-対照群、対照群-対照群個体と、いろいろな組み合わせで半年間追って行きます。

第 3 レベルは知能検査です。このスライドはどこでも誰でも行えて、どのサルでも興味を持つ知能検査をしたいというので、開発してきた指迷路試験です。現在では 4 段指迷路という試験になっています。実際にはリング片をスリット付きボックスに入れるわけです。サルはリングが好きですから、すぐに見つけてこれを取ろうという努力をします。しかし、ここにスリットが切つてありますから、指を突っ込んで動かすわけです。間違いの方に動かすと、エラーボックスでリングは取れない。正解になるとリングがもらえる。第 1 段をクリアすると、第 2 段に進むわけです。しかし、実は意地悪く 2 段目は方向が反対になっています。第 1 段でクリア

一した戦略を使おうとすると、あっという間にエラーボックスに行くので、第1段の戦略をキャンセルして反対側に向かわなければいけない。3段目はまたその反対、4段目はさらに反対というタスクをかけます。

このスライドは実際に試験を受けているところですが、このテストを人間の子どものでもやると大体3歳より上でないと成功しない。サルは早熟なので、1歳から1歳半でこなしていきます。例えば第1段階は1日に2回、2セッションで15トライアルします。そのうち14トライアル以上連続して2セッション成功すると、第2段に上がるということをして、第4段まで到達します。これまで安田先生のグループとの共同研究でTCDDに曝露されたアカゲザルの子どもについて測ってきました。今、データの整理をしているところです。どうも300ng（ナノグラム）、最も高容量で処理したグループがなぜか成績が最もよく、一番早く4段までクリアしてしまって、予想と反して今、頭を悩ませているところです。指迷路試験の成績と、出合わせ実験での社会性の特性解析、あるいはアイコンタクト実験による内向性などの項目との相関分析を行い、TCDDの影響を評価する予定です。

第4レベルは、ラットのところで説明しましたが、薬剤誘発試験です。これは井上先生のグループと一緒にやったメタアンフェタミンのアカゲザルへの投与実験です。ほかにL・ドーパ、カフェイン、コカインを含め、いくつかの薬について、タスクを与えて行動解析するか、あるいはフリーの行動について自動解析装置を用いて、ラットと同じように評価するか、その辺は今戦略を考えています。このようにラット、サル、ヒトと行動レベルの評価を持ち上げて外挿していくわけです。行動解析の基本になるのはサーカディアンリズムです。ヒトの場合はきっと小児科のお医者さんが子どもに、「昨日何時に寝て、朝何時に起きましたか？」というのを、年間を通して聞くような格好になるのかと思います。

オープンフィールドの新奇場面はヒトでは幼児の公園デビューに当たるかもしれません。母子行動に関してはヒトでは非常に多くのデータが蓄積されています。また、出合わせ実験は幼稚園に行くと、子どもたち同士のつき合いの場面に相当するかもしれません。それから学習記憶になりますと、ラットのシャトル・アボイダンス、あるいは水迷路試験、サルでは指迷路試験になります。サルでは1歳半でクリアします。ヒトの方は3歳で、少し遅れますが、テストは可能です。それから薬剤誘発試験。これはラット、サル、どちらも可能ですが、ヒトは不可能です。実験的に外挿することは難しいと思います。このように各レベルで得られる行動評価をヒトと比較して、内分泌攪乱化学物質の神経発達への影響を明らかにするのが目的です。勿論、こうして評価された行動異常が脳のどの部位の発達異常の結果であるか、組織学的・細胞学的レベルの研究に結びつけ、そのメカニズムを明らかにすることが最終目的になります。

さて、話が3番目になります。これまではラボラトリーでやる実験の戦略を述べてきたわけです。これからは野生のサルが主役です。ご存じのように、日本は先進国では数少ないサル類の生息国です。北限のニホンザルを持っています。観光用を含め、あちこちに野猿公園があって餌づけをしています。それを対象に社会行動の実験をしたり、イモ洗いのサルのような、人間以外の文化論がわかってきたわけです。

ところで、日本では1970年代初期、いっせいにあちこちの野猿公園でサルの奇形、特に四肢の先端の奇形が出てしまって大問題になりました。どこで出たかという、野性のサルには出ないで、餌づけ群の野猿公園のサルに1970～1975年の間に集中して出てきました。そのため急遽、文部省の研究班ができて、いろいろな側面から解析をしました。最初、ある程度の家族集積性があるということになったのですが、交配実験を含めて、遺伝解析をした結果、単一の優性、あるいは劣性遺伝形質はすぐに否定されました。また栄養や中毒、風疹のように特殊な奇形を起こすウイルス感染など、いろいろな検査項目で調べていったのですが、何れも否定されました。そして最後には、おそらく飼料の中に入っていた農薬であろうというのが第1候補に挙がったのです。しかし、実際には当時使用していた輸入飼料を変えてしまって、その後こういう奇形が出てこないということで、研究は止まってしまいました。

ニホンザルの場合は野猿公園のほかに野性のサルが下北半島まで分布しているわけで、彼らの生息地域が人家に近づいていることもあり、農薬や環境化学物質に触れる機会というのは多いわけです。ラボラトリー・ワークとこういうフィールドワークの共同研究ができ、さらに前演者のような細胞レベルあるいは遺伝子レベルの研究とつながっていけば、より有意義だろうと思われれます。

高等動物では環境化学物質が、内分泌系、あるいはより高度な神経系に関して、本当に強い影響を与えているかどうかは、まだ議論の余地が多いと私は考えております。内分泌攪乱作用はステロイド類似物質から始ま

ったわけですが、前演者の言われたように、甲状腺ホルモンの類似構造物質群が、神経発達に影響を与える可能性が強く言われてきております。しかし、今日お示しましたように、なかなかそのリスク評価をするといってもそう簡単なことではありません。特に個別の解析ではなくて、体系的に系統発生を上げてみようということになると、かなりの戦略を組んでおかないと、単発におわり、全体像を見ることができません。またラボラトリーワークだけではなくて、フィールドワークと共同研究するというシステムで全体的に攻めないで、本当のリスク分析は難しいだろうと考えております。

スライドは以上です。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

鯉淵：どうもありがとうございます。ディスカッションの時間を取りたいと思います。質問はございませんか？はい、どうぞ。

質問：先程の TCDD で、300 ng で頭がよくなるというお話なのですが、サルの場合は母親に曝露されているのですよね。

吉川：はい。母親を曝露している。

質問：曝露された母親の子どもに対するソーシャルコンタクトが増えて、それによって向上するのではないかという話がある。

それから学習行動一般的に、例えばラットの radial rays などでは、海馬を破壊してしまうと記憶からの参照がなくなって、記憶を参照して迷うことがなくなり、場合によっては結果的にパフォーマンスが向上するという報告もあるので、必ずしもダイオキシンによってパフォーマンスが向上しても悪くはないのではないかと。同じ理由で今、4 段でやられているわけですが、5 段、6 段、7 段と増やしていったら少し複雑にしていくと、また違う影響が見られるのではないかと思います。

吉川：最初の問題のマターナルケアが影響することは十分考えられます。ただ、この実験はすでに先発したものをこの系で評価したので、実は 1 歳を過ぎてから、僕らはこのサルを入手して測ったので、そのデータがないのです。BPA で今度追いかけるときには、そこから取ろうということを考えております。

それから今のラットのお話は非常に参考になりますが、ただ、実際にこれを僕自身が開発したのは、むしろアルツハイマーモデルを老齢のサルで測るために、この系を作ってきて、ある方向の戦略を決めて固執してしまうと、第 1 段目はわりあいすと突破するのです。しかし、第 2 段目は猛烈な時間がかかるので、4 段までかなりの速さでクリアするというのは、必ずしも短絡的ではなくて、やはり柔軟性を持った戦略でないと、この指迷路は成功しない。それから 5 段、6 段と上げていくと、あまり報酬までの時間がかかりすぎて、途中でドロップアウトしてしまうサルが多くて、1 段からだんだん系を組んでいったのですが、大体 4 段ぐらいが再現性が一番

高いということで、現在 4 段の指迷路を使っています。

鯉淵：ライス博士からコメントがあるようです。

ライス：私はあなたの TCDD に関する所見と指迷路についてコメントしたいと思います。あなたはスー・チャンスをご存知だと思いますが、彼女がダイオキシンに関する研究を行ったときに、彼女も、何種かの識別課題で促進されたパフォーマンスが見られたが、他の課題では障害があるとことを確認しています。

彼女のグループは、そのことが、対照群のサルは投与群のサルよりも自分が置かれた環境の異なる側面を調べまわると強いという事実を示していると解釈しました。なぜなら、投与群のサルでは無関係な刺激が存在する条件で促進されたパフォーマンスが見られるためです。

私はその説明にはあまり満足できませんでした。それは実際のところ、事後に作り上げた「ただそうなのだから」という説明でしかありません。私はなぜこれが起きているのか分かりませんが、あなたのデータは TCDD に関する他のサルのデータとの矛盾はありません。従って、私はあなたの研究結果は本当に興味深いと思います。

吉川：興味あるサジェスションをありがとうございました。そういう目でもう一回検討してみたいと思います。

鯉淵：どうもありがとうございます。他に質問はございませんか？はい、どうぞ。

質問：2 つ質問があります。

1 つは、ビスフェノール A 曝露の方法なのですが、継続的に強制経口投与は非常に大変だというのは私も納得します。先生は自然な曝露経路に非常に重点を置いていらっしゃいましたが、こういった実験では飲水の中に投与するとか、飲水の中に一定の濃度を混ぜるといった方法が一般的だと思われるのですが、なぜそういった方法を採用されなかったか。

もう 1 つは、ビヘイビアの型にはいつも私は疑問に思っているのですが、特に雌において性周期が回帰したときの性周期の時期によって、非常に行動に

影響を与えることがあります。あれは 8 週令のデータでしたから、おそらく性周期がもう回帰していると思うのですが、そういったものについては何かご検討されているのでしょうか。

吉川：今回してもらった実験は、ある意味ではドースがかなり高いので、ビスフェノール自身が疎水性でなかなか溶けないのです。それと、水とか餌に混ぜた場合、完全に処理できるかどうかという問題があって、一応これもラボラトリー実験で、パイロットでラットから始めるということだったので、ある意味で自分でコントロールの効く方法論として、ゾンデで飲ませるという方法をとってしまいました。

それから今回、僕らが興味を持ったのは、雄の雌化とか、雌の異常というよりも、同じ性の中でどのように違うだろうかという比較をしていたので、データもみんなそういう分析をしているのです。性差の出るものでないケースで違いが出るだろうかという評価をしていって、先程示したようなポイントのところは、それぞれのタームポイントで同群の中でドーズによって差が出たという意味です。

質問：先生のデータは性差の比較というかたちではなかったから、そういう意味ではとても適正だと思ったのです。けれども、例えば雌の中で比較した場合、行動に影響があったというとき、例えばランダムに取っていったとき、性周期が例えば延長していた場合、そういったものを間接的に評価している可能性が出てくるのではないかと思うのです。

吉川：それは出てくる可能性がある。だから雌の場合にはかなり注意をしないとならないとは思いますが。

鯉淵：他に質問はありませんか？ないようです。吉川博士、どうもありがとうございました。